云 南 植 物 研 究 2006，28 (6)：565～569
Acta Botanica Yunnanica

利用 RAPD 技术分析云南兰属部分种的种间关系*

程少丽[1]，李枝林[2]，张俊祥[1]，范成明[1]，赵明富[1]，何月秋[1]**
(1 云南农业大学农业生物多样性与病虫害控制教育部重点实验室，云南 昆明 650201；
2 云南农业大学园林园艺学院，云南 昆明 650201)

摘要：采用 RAPD 技术对云南兰属的 11 个种和 3 个变种中的 39 个样本进行了相似性分析。在相似系数 0.58 水平上，大花亚属的虎头兰、西藏虎头兰、长叶兰和碧玉兰聚为一支；建兰亚属的寒兰、墨兰、蜜蜂兰、蕙兰、春兰、豆瓣兰、春剑、莲瓣兰和送春聚为另一支，兔耳兰与大花亚属关系更近。春剑和莲瓣兰相似性更高，它们与春兰的关系较远，不支持送春作为蕙兰下的变种。这些结果可为开展兰属育种提供重要参考价值。

关键词：兰属；RAPD；遗传多样性；相似性
中图分类号：Q 943，Q 949 **文献标识码**：A **文章编号**：0253 - 2700(2006)06 - 565 - 05

Similarity Analyses of Some Species of *Cymbidium* (Orchidaceae) from Yunnan Province Using RAPD Technique

CHENG Shao-Li[1]，LI Zhi-Lin[2]，ZHANG Jun-Xiang[1]，FAN Cheng-Ming[1]，
ZHAO Ming-Fu[1]，HE Yue-Qiu[1]**
(1 *Key Laboratory of Agro-diversity and Pests and Diseases Control*，*Ministry of Education of China*，*Yunnan Agricultural University*，Kunming 650201，China；2 *College of Gardening and Horticulture*，*Yunnan Agricultural University*，Kunming 650201，China)

Abstract: Thirty-nine accession of eleven species and three varieties of *Cymbidium* in Yunnan Province were analyzed by using RAPD technique . Sampled species in subgenus *Cyperorchis*，including *C. hookerianum*，*C. tracyanum*，*C. erythraeum*，and *C. lowianum* are clustered into a clade; while species in the subgenus *Jensoa*，including *C. kancan*，*C. sinense*，*C. pumilum*，*C. faberi*，*C. goeringii*，*C. goeringii* var. *serratum*，*C. tortisepalum* var. *longibracteatum*，*C. tortisepalum* and *C. cyperifolium* var. *szechuanicum* are classified into another clade . *C. lancifolium* is closer to subgenus *Jensoa* than to the others . *C. tortisepalum* var. *longibracteatum* is close to *C. tortisepalum* var. *tortisepalum* and both of them are far from *C. goeringii* . It is not supported that *C. cyperifolium* var. *szechuanicum* belongs to a variety of *C. faberi* . These findings may benefit to *Cymbidium* breeding .

Key words: *Cymbidium*；RAPD；Genetic diversity；Similarity

广义上的兰花是整个兰科植物 (Orchidaceae) 的总称，约有 1000 属，近 2 万种，人工杂交种更在 4 万个以上。我国有 166 属 1019 种 (陈俊愉，2001)。云南由于地形地貌复杂，且位于兰科植物分布中心——中国 - 喜马拉雅森林植物亚区，兰科植物种类十分丰富，5 个亚科均有分布，约 100 属 530 余种，又以兰属、兜兰属、石斛属、杓兰属、万带兰属、鹤顶兰属、指甲兰属、白芨属、独蒜兰属等分布相对集中，占全国各属中的大多数种类，作为育种亲本的种质资源，是全国乃至全球兰艺界瞩目的宝库 (王利民等，2005)。但狭义上的兰花，仅指兰科中的兰

* 基金项目：国家自然科学基金项目、云南省科学基金重点项目“云南野生兰花遗传资源研究及利用”(30160074，2002C0003P)
** 通讯作者：Author for correspondence E - mail：heyueqiu@tom.com 电话：0871 - 5228532
收稿日期：2006 - 01 - 20，2006 - 04 - 18 接受发表
作者简介：程少丽 (1981 -) 女，在读硕士研究生，主要从事植物系统发育学研究。

属（*Cymbidium*）植物，全世界约 48 种，云南约 29 或 30 种（含变种）(陈心启，1999；潘光华和潘蕾，2003；王卜琼等，2005)，它们具有重要的药用和观赏价值，涵盖了温带（高山)、亚热带、热带 3 大气候区的多种生活习性的地生兰、阴生兰和腐生兰类。兰花的分类方法很多，如根据花期或者生态类型的分类方法，但依据形态特征是国际上通用的分类方法。现有的兰属分类系统是基于植株根、茎、叶片、花的各部分细微构造上的差异，制定检索表，进行种和变种查询(刘金和潘光华，1998)。由于兰属植物种间有杂交现象，呈现出中间类型多样，部分种的界限不清，给属内种的分类带来了一定的困难，因而导致各研究者所得到的分类系统不尽相同（刘金和潘光华，1998；陈心启，1999；吴应祥，1993)。

RAPD（Random Amplification Polymorphic DNA）技术因所需 DNA 较少、快速、费用低及操作简单，已被广泛地用于植物亲缘关系分析（Williams 等，1990)。在兰花的亲缘关系研究中，Grünanger 等（1998）用 RAPD 技术分析意大利产的 *Ophrys bertolonii*（眉兰）及两个近缘种 *O. sphegodes* 和 *O. fuciflora*，有效地将 *O. bertolonii* 同这两个近缘种区分开来。梁红健等（1996，1997）和王慧中等（2004）分别利用 RAPD 技术对中国部分兰属植物进行了研究，明确了部分种内品种间的亲缘关系，并指出，兰属各种间的聚类结果与形态学分类的结果不完全一致。尽管云南省兰属植物种类多，但有些种在分类关系上不甚清楚。本研究采用 RAPD 技术，以采自云南省不同生态条件下的野生兰花为材料开展基因组水平上分析，旨在揭示云南省兰属中 10 个种和 3 个变种间的相关性，并为兰花育种提供理论依据。

1　材料和方法

1.1　材料

所有 39 个兰花样本均为云南省野生兰花，包括 11 个种和 3 个变种，并栽培于云南农业大学园林园艺学院温室苗圃中。样本的中文名和拉丁学名（表 1）以陈心启(1999)、陈心启和刘仲健（2003）的分类系统为依据。

1.2　方法

1.2.1　DNA 的提取　采用 CTAB 法（Doyle and Doyle, 1987）提取基因组总 DNA。

表 1　材料名称及采集地点

Table 1　Names and locality of *Cymbidium*

序号 Code	种类 Species	采集地 Collection site
T1	虎头兰 *Cymbidium hookerianum* Rchb . f	大理市宾川县
T2	虎头兰 *C. hookerianum* Rchb . f	思茅市西盟县
T10	虎头兰 *C. hookerianum* Rchb . f	大理州南涧县
T3	碧玉兰 *C. lowianum* Rchb . f	文山州西畴县
T11	碧玉兰 *C. lowianum* Rchb . f	思茅市西盟县
T4	西藏虎头兰 *C. tracyanum* L . Castle	迪庆州中甸县
T5	西藏虎头兰 *C. tracyanum* L . Castle	临沧市凤庆县
T6	西藏虎头兰 *C. tracyanum* L . Castle	大理州南涧县
T7	长叶兰 *C. erythraeum* Lindl	思茅市
T8	长叶兰 *C. erythraeum* Lindl	临沧市永德县
T9	长叶兰 *C. erythraeum* Lindl	临沧市永德县
T12	兔耳兰 *C. lancifolium* Hook	思茅市
T13	兔耳兰 *C. lancifolium* Hook	文山州西畴县
T14	莲瓣兰 *C. tortisepalum* Y.S.Wu et S.C.Chen	昆明市安宁县
T15	莲瓣兰 *C. tortisepalum* Y.S.Wu et S.C.Chen	怒江州贡山县
T16	莲瓣兰 *C. tortisepalum* Y.S.Wu et S.C.Chen	怒江州贡山县
T17	莲瓣兰 *C. tortisepalum* Y.S.Wu et S.C.Chen	怒江州福贡县
T19	春剑 *C. tortisepalum* var. *longibracteatum* Y.S.Wu et S.C.Chen	文山州西畴县
T20	春剑 *C. tortisepalum* var. *longibracteatum* Y.S.Wu et S.C.Chen	文山州麻栗坡县
T21	春剑 *C. tortisepalum* var. *longibracteatum* Y.S.Wu et S.C.Chen	大理市
T18	蕙兰 *C. faberi* Rolfe	昆明市禄劝县
T23	蕙兰 *C. faberi* Rolfe	大理市
T24	蕙兰 *C. faberi* Rolfe	大理市
T25	蕙兰 *C. faberi* Rolfe	昆明市
T22	蜜蜂兰 *C. pumilum* Rolfe	保山市龙陵县
T37	蜜蜂兰 *C. pumilum* Rolfe	文山州马关县
T26	墨兰 *C. sinense* Willd	文山州麻栗坡县
T27	墨兰 *C. sinense* Willd	文山州麻栗坡县
T28	墨兰 *C. sinense* Willd	文山州麻栗坡县
T29	送春 *C. cyperifolium* var. *szechuanicum* Y.S.Wu et S.C.Chen	大理市
T30	送春 *C. cyperifolium* var. *szechuanicum* Y.S.Wu et S.C.Chen	昆明市安宁县
T34	送春 *C. cyperifolium* var. *szechuanicum* Y.S.Wu et S.C.Chen	怒江州贡山县
T31	春兰 *C. goeringii* Rchb . f .	大理市宾川县
T32	春兰 *C. goeringii* Rchb . f .	大理市宾川县
T33	春兰 *C. goeringii* Rchb . f .	大理市宾川县
T35	豆瓣兰 *C. goeringii* var. *serratum* Y.S.Wu et S.C.Chen	文山州西畴
T36	豆瓣兰 *C. goeringii* var. *serratum* Y.S.Wu et S.C.Chen	文山州西畴
T38	寒兰 *C. kancan* Makino	思茅市
T39	寒兰 *C. kancan* Makino	思茅市

1.2.2　RAPD 分析　采用 25 μl 反应体系：1.0 μl DNA 模板（10 ng/μL），2 μl $MgCl_2$（25 mmol），2.0 μl dNTP（2.5 mmol），2.5 μl 10×Buffer，1.5 U Taq DNA 聚合酶（晶美公司产品），2 μl 引物（10 μmol，上海申友生物技术有限责任公司合成）；反应程序：95℃ 5 min，94℃ 1 min，36℃ 1 min，72℃ 2 min，循环 40 次，72℃延伸 10 min。

1.2.3　数据处理　PCR 反应产物在 1.5%的琼脂糖凝胶上检测，经溴化乙锭溶液染色后，显影照相。每一条亮带视为一个位点，存在者计"1"，不存在者计"0"，将结果制成 0/1 矩阵。用统计软件 Statistic 聚类分析方法中的 UPGMA 联结规则，采用 Percent disagreement 方法，得到各样本的分析聚类图。

2　结果

2.1　遗传多样性

从 200 条随机引物中筛选出多态性好、稳定性高的 15 条引物，共扩增 140 条带（表 2），但各引物对扩增的条带数存在一定的差异，最多的为引物 BA0402，扩增出 13 条，最少的为引物 BA0374 和 BA0344，仅扩增出 6 条带（表 2）。平均每条引物的扩增带数为 9.3 条，扩增条带的大小主要集中在 300 bp～1600 bp 之间，每条引物的多态率均为 100%，表明供试的云南省国兰中的兰属样品具很高的遗传多样性。

表 2　15 条引物序列及统计结果

Table 2　Sequences of 15 primers and amplification data

引物名称 Primer	序列 Sequence	扩增条带数 Band	多态带数 Polymorphic band	多态率(%) Polymorphic rate
BA0402	ACAACGCCTC	13	13	100
BA0422	ACCAGGGGCA	10	10	100
BA0399	GAGTGGTGAC	9	9	100
BA0384	GACTGCACAC	8	8	100
BA0374	CCCGCTACAC	6	6	100
BA04O4	GGCGGTTGTC	10	10	100
BA0425	ACTGAACGCC	12	12	100
BA0353	CCACACTACC	12	12	100
BA0405	GGGAACGTGT	12	12	100
BA0324	AGGCTGTGCT	9	9	100
BA0331	CTCAGTCGCA	9	9	100
BA0347	CCTCTCGACA	8	8	100
BA0344	CCGAACACGG	6	6	100
BA0337	CCTTCCCACT	8	8	100
BA0330	CCGACAAACC	8	8	100
总数 Total		140	140	-
平均 Mean		9.3	9.3	100

2.2　种间关系分析

从图 1 可以看出，所研究的种类关系清楚，39 个样本的种间相似系数在 0.54～0.82 之间。在相似系数 0.58 的水平上，39 个兰花样品可分成两支。第一支（A 支）：虎头兰（样本号 T1，T2，T10）、碧玉兰（T3，T11）、西藏虎头兰（T4，T5，T6）、长叶兰（T7，T8，T9）、兔耳兰（T12，T13）；第二支（B 支）：莲瓣兰（T14，T15，T16，T17）、春剑（T19，T20，T21）、惠兰（T18，T23，T24，T25）、蜜蜂兰（T22，T37）、送春（T29，T30，T34）、春兰（T31，T32，T33）、豆瓣兰（T35，T36）、墨兰（T26，T27，T28）、寒兰（T38，T39）。第一支和第二支的相似系数为 0.54。

3　讨论

依据陈心启（1999）的分类系统，大花亚属包括虎头兰、西藏虎头兰、长叶兰和碧玉兰；建兰亚属包括兔耳兰组和建兰组，其中兔耳兰自成一组，建兰、墨兰、寒兰、蕙兰、春兰和莲瓣兰属建兰组。依据吴应祥（1993）的分类系统，将国产兰属划分为兰组和蕙组。兰组仅春兰 1 种，含豆瓣兰变种；蕙组分为 5 个亚组，建兰、墨兰、寒兰、蕙兰和莲瓣兰划为小花亚组；兔耳兰划入兔耳兰亚组；将虎头兰、西藏虎头兰、长叶兰和碧玉兰作为大花亚组。张明永等（2000）运用 PCR 扩增和直接测序的方法分析了兰属 27 种、3 个栽培品种以及 3 个外来群体 nrDNA 的 ITS 区段序列。结果表明兰属的 3 个亚属（兰亚属、大花亚属和建兰亚属）可能均是不自然的类群。大花亚属不是一个单系群，兰亚属的冬凤兰隐藏于其中；建兰亚属为一并系群，它的成员之一兔耳兰偏离出去，成为兰属的一个最基部分支；兰亚属为一复系群，它分为几支，分别与另两个亚属组合在一起。但由于 ITS 序列的信息量不充分，未能将亚属的界限划分清楚。本研究的 RAPD 聚类结果表明，除兔耳兰之外，其它种兰花与陈心启（1999）的分类系统一致，即所有大花亚属的品种聚为第一支（A 支），所有建兰亚属的品种聚为第二支（B 支）。在兔耳兰的划分上，王慧中等（2004）用 RAPD 技术分析的结果表明，兔耳兰与大花亚属材料属于同一组，但 AFLP 技术分析的结果则表明兔耳兰与建兰亚属聚在同一支。张明永等（2002）的结果表明兔耳兰位于兰属植物的

一个最基部分支。我们的 RAPD 结果与王慧中等 (2004) 的 RAPD 分析结果一致，即兔耳兰与大花亚属关系更近。由此看来，兔耳兰的系统分类定位还有待于采用更多样本做进一步确证。

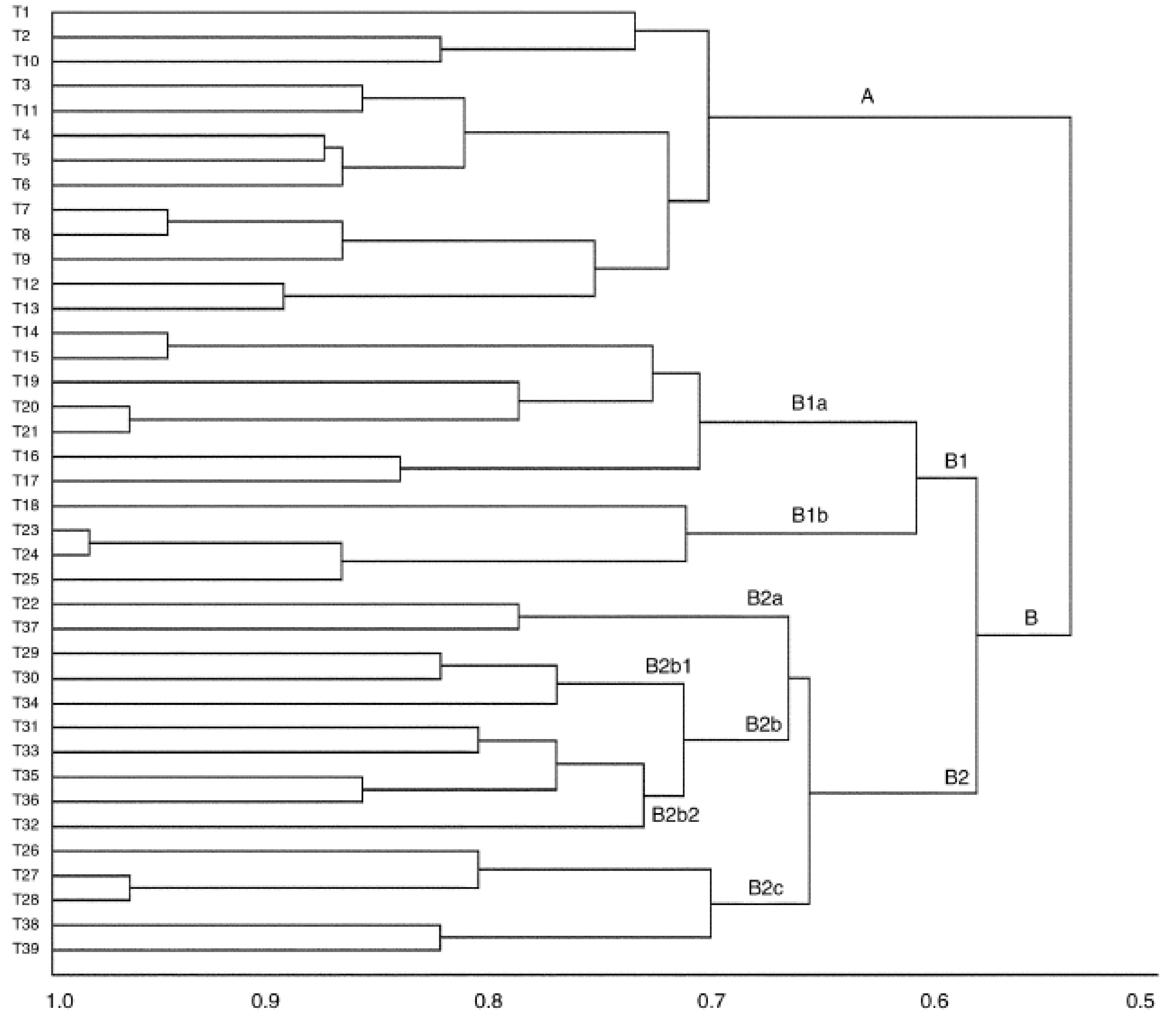

图 1　39 个样本的 RAPD 聚类分析

Fig . 1　Dendrograph of the 39 samples based on RAPD data

莲瓣兰、送春和春剑是兰属中广为栽培但颇有争议的分类群 (陈心启和刘仲健, 2003)。陈心启和吴应祥 (1980) 将春剑和莲瓣兰作为春兰种下的两个变种。由于春兰叶的下部有关节，花序通常只具 1 朵花，而春剑与莲瓣兰叶的下部无关节，花序通常具 3～5 朵花，陈心启和刘仲健 (2003) 又将春剑与莲瓣兰从春兰中移出来作为莲瓣兰下的两个变种。我们的 RAPD 聚类结果表明，莲瓣兰和春剑相似性较高，都被聚类到第 2 支的 B1a 分支中，而这个分支与被划分到 B2b2 分支内部的春兰相距较远。我们的 AFLP 结果 (待发表) 也表明莲瓣兰和春剑关系最近，与春兰关系较远。陈心启 (1980) 将送春作为蕙兰的变种，并一直为国内兰花分类界所接受。尽管 Du and Cribb (1988) 承认送春变种，但他们指出送春与莎叶兰 (*C. cyperifolium*) 更为相似。陈心启和刘仲健 (2003) 再次比较了送春、蕙兰和莎叶兰的许多形态特征，认为送春的根毛、假鳞茎、叶的特征均明显接近莎叶兰，并将其移入莎叶兰下作为一个变种 (*C. cyperifolium* var. *szechuanicum*)。本研究也支持将送春从蕙兰中移出。如送春 (T29, T30 和 T34) 与蕙兰 (T18, T21,

T23 和 T25）在相似系数为 0.61 水平上被分为不同的类群中，前者属于 B2 亚支的 B2b1 支系，后者属于 B1 亚支中的 B2b 支系。

尽管 RAPD 技术自身存在某些不足，但已被广泛应用于种、亚种、变种、品种或不同基因组的亲缘演化关系和分类等方面的研究（Demeke 等，1992；Kazan 等，1992；Susan 等，1993）。从我们的结果来看，筛选出稳定性高、多态性好的引物，且样本足够多的条件下，RAPD 技术亦能用于种间的相似性关系分析。本文采用 RAPD 技术，进一步明确了云南兰属主要种间的相似关系，特别是明确了常见的国兰中的春兰、蕙兰、寒兰、墨兰、莲瓣兰等的亲缘关系，并澄清了部分变种的归属，故这些结果能为兰花育种和研究其系统发育提供一些参考价值。

〔参 考 文 献〕

刘金，潘光华．兰花［M］．北京：中国农业出版社，34—35

吴应祥，1993．中国兰花（第 2 版）［M］．北京：中国林业出版社，26—64

陈俊愉，2001．花卉品种分类［M］．北京：中国林业出版社

陈心启，1999．兰科，中国植物志（第 18 卷）［M］．北京：科学出版社，191—227

陈璋，2004．大花蕙兰［M］．北京：中国林业出版社

潘光华，潘蕾，2003．云南名兰宝鉴［M］．海口：海南出版社

Chen SC（陈心启），Liu ZJ（刘仲健），2003．Critical notes on some taxa of *Cymbidium*［J］．*Acta Phytotax Sin*（植物分类学报），**41**（1）：79—84

Doyle JJ，Doyle JL，1987．A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue［J］．*Phytochem Bull*，**19**：11—15

Du Puy D，Cribb P，1988．The Genus *Cymbidium*［M］．London，Portland，Oregan：Christophor Helm Timber Press，1—204

Demeke T，Adama RP，Chibbar R，*et al*，1992．Potential taxonomic use of random amplified polymorphic（RAPD）：A case study in *Brassica*［J］．*Theor Appl Genet*，**84**：990—994

Grünanger P，Caporali E，Marziani G，*et al*，1998．Molecular（RAPD）analysis on Italian taxa of the *Ophrys bertolonii* aggregate（Orchidaceae）［J］．*Plant System Evol*，**212**（3-4）：177—184

Kazan K，Manners JM，Cameron DF，*et al*，1992．Genetic relationships and variation in the *Stylosanthes guianensis* species complex assessed by random amplified polymorphic DNA［J］．*Genome*，**36**（1）：43—49

Liang HJ（梁红健），Liu M（刘敏），Zhong ZY（钟志宇），*et al*，1996．Identification and classification of Chinese *Cymbidium* with RAPD［J］．*Acta Hort Sin*（园艺学报），**23**（4）：365—370

Liang HJ（梁红健），Liu M（刘敏），Zhang CH（张纯花），*et al*，1997．Chinese *Cymbidium* cultivars classification with leaf isozyme polymorphism［J］．*Acta Biolog Experimen Sin*（实验生物学报），**3**（30）：343—348

Susan EW，Peter GI，Robert JS，1993．Random amplified polymorphic DNA（RAPD）markers for genetic analysis in *Allium*［J］．*Theor Appl Genet*，**86**（4）：497—504

Wang BQ（王卜琼），Li ZL（李枝林），Yu CX（余朝秀），2005．Progress on orchid breeding study［J］．*Acta Hort Sin*（园艺学报），**32**（3）：551—55

Wang HZ（王慧中），Wang YD（王玉东），Zhou XY（周晓云），*et al*，2004．Analysis of genetic diversity of 14 species of *Cymbidium* based on RAPDs and AFLPs［J］．*Acta Biolog Experimen Sin*（实验生物学报），**37**（6）：482—486

Wang LM（王利民），Wang SQ（王四清），Yang YF（杨玉锋），2005．Germplasm resources and breeding of orchids［J］．*J Anyang Institute Technol*（安阳工学院学报），（14）：5—10

Williams JG，Kubelik AR，Livak KJ，*et al*，1990．DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers［J］．*Nucleic Acids Res*，**18**：6531—6535

Wu YS（吴应祥），Chen SC（陈心启），1980．A taxonomic review of the orchid genus *Cymbidium* in China［J］．*Acta Phytotax Sin*（植物分类学报），**18**：292—307

Zhang MY（张明永），Sun CY（孙彩云），Hao G（郝刚），*et al*，2000．A preliminary analysis of phylogenetic relationships in *Cymbidium*（Orchidaceae）based on nrITS sequence data［J］．*Acta Bot Sin*（植物学报），2002，**44**（5）：588—592